

Agilent Online SPE-6475TQ를 이용한 수질 내 마이크로시스틴 분석 솔루션

저자

최나영, 김지훈, 정중목
한국애질런트테크놀로지스 (주)

개요

본 연구는 Agilent의 Online SPE-6475TQ를 활용한 수질 내 마이크로시스틴(Microcystin, MC) 6종(MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LY, MC-RR, MC-YR) 정량을 위한 효과적인 분석 솔루션을 제시합니다. 마이크로시스틴은 환경과 인간 건강에 부정적인 영향을 미치는 수질 오염의 주요 지표 중 하나로 국내외로 규제와 모니터링이 진행되고 있는 화합물질입니다.

Agilent Online SPE-6475TQ는 온라인 고체상 추출 기술과 고해상도 Tandem Mass Spectrometry (Triple Quadrupole, TQ)를 결합하여, 정밀하고 신속한 수질 내 마이크로시스틴 분석을 가능하게 합니다. 이를 통해 수질 모니터링과 관리에 있어서 높은 효율성과 정확성을 동시에 보장합니다. 연구의 목적은 수질 내 마이크로시스틴 6성분에 대한 정량적 분석을 통해 Agilent Online SPE-6475TQ의 성능을 검증하고, 이를 토대로 물 환경 분석에 기여하는 것입니다.

서론

마이크로시스틴(Microcystin, MC)은 청록색 미세생물인 시아노박테리아가 생성하는 독성 물질 중 하나로, 주로 청록색 담수 및 염수에서 발생합니다. 이 독성 물질은 물 환경의 안전성을 위협하는 주요한 요소 중 하나로 인식되며, 그 독성과 안정성으로 인해 환경 및 인체에 부정적인 영향을 미칠 수 있습니다. 특히 물에서 발생한 마이크로시스틴을 섭취하거나 피부에 접촉할 경우 중독성과 암을 유발할 수 있습니다. 또한, 마이크로시스틴은 수생 생태계에도 부정적인 영향을 미칠 수 있으며, 물에서 증식한 마이크로시스틴은 어류의 사멸을 유발하고 생태계의 균형을 깨트림으로써 생태적 다양성을 감소시킬 수 있습니다. 이러한 이유로 마이크로시스틴은 수질 오염의 주요 지표 중 하나로 간주되며, 수질 내 마이크로시스틴을 관리하고 모니터링하는 것은 물 환경의 건강 상태를 평가하고 보존하기 위한 중요한 단계입니다.

본 연구에서는 Agilent의 Online SPE와 최신 분석 장비인 6475TQ를 활용하여 수질 내 국내에서 규제하는 6종의 마이크로시스틴의 자동화된 정량 분석 솔루션을 제시합니다. Agilent Online SPE-6475TQ는 온라인 고체상 추출 기술을 기반으로 하며, 탁월한 민감성과 높은 정확도를 제공하여 수질 내 마이크로시스틴 농도를 정확하게 측정할 수 있습니다. 또한 온라인 분석을 통해 사용자의 편리성과 분석 효율성을 극대화할 수 있습니다. 이를 통해 더욱 정밀하고 효과적인 수질 분석 관리에 기여할 것으로 기대됩니다.

실험

검량선 표준액 및 시료 준비

검정 표준용액과 내부 표준용액을 조제하기 위하여, 마이크로시스틴 표준원액 6종(MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LY, MC-RR, MC-YR)을 메탄올에 녹여 각각 10ppm 이 되도록 조제하여 냉장 보관합니다. 검정 표준용액은 표준원액을 20% 메탄올로 순차적으로 희석하여 50ppt-2000ppt 범위가 되도록 조제하여 분석에 사용합니다.

먹는 물 내 마이크로시스틴 정량 분석을 위해, 수돗물(이하 정수라 함)을 시료로 사용합니다. 정수 적정량을 튜브에 받은 뒤, 메탄올과 정수의 비율이 20:80 (v/v) 이 되도록 메탄올을 첨가하여 충분히 섞은 다음 바이알에 옮겨 시료 준비를 완성합니다.

회수율 평가를 위해, 준비한 정수에 메탄올로 희석된 혼합 표준품을 첨가하여 정수 시료 내 농도가 각각 50ppt, 500ppt, 1000ppt가 되도록 조제합니다. 충분히 섞은 뒤, 각각의 바이알로 옮겨 QC 시료를 준비를 합니다.

분석 기기

- Agilent 1290 Infinity II High-Speed Pump (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B), 시료 온도 조절 장치, 900µL 미터링 디바이스 및 루프 포함
- Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity FlexCube (G4227A)
- Agilent 1290 Infinity II Flexible Pump (G7104A)

컬럼

- 분석 컬럼: Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 2.1 x 100mm, 1.9µm (P.N. 695675-702)
- 카트리지: Agilent PLRP-S, 2.1 x 12.5mm, 5µm (P.N. 5982-1271)

소프트웨어

- Agilent MassHunter Acquisition (ver. 12.1)
- MassHunter Qualitative Analysis (ver. 12.0)
- MassHunter Quantitative Analysis (ver. 12.1)

Online SPE 구성

Online SPE LC 시스템은 Agilent Infinity II FlexCube와 Agilent 1290 Infinity II Flexible 펌프를 활용하여 구성되었습니다. 이 시스템은 FlexCube에 장착된 Agilent InfinityLab Quick Change 밸브를 특징으로 합니다. 본 실험을 위해 좌측에는 2-포지션/10-포트 밸브, 우측에는 2-포지션/6-포트 밸브로 구성하였으며, 우측의 2-포지션/6-포트 밸브를 조절하여 Online SPE LC 시스템을 운영할 수 있습니다.

초기에 밸브는 1번 포지션(포트 1→6)으로 설정되어 시료 주입을 준비합니다 (그림 1A). 멀티샘플러에 연결된 쿼터너리 LC 펌프를 통해 시료가 카트리지(SPE)에 로딩됩니다. 그 후, 밸브는 2번 포지션(포트 1→2)으로 전환되어 바이너리 펌프에 의해 이동상에 기울기가 주어져 로딩된 시료가 SPE에서 백플러시 모드로 용출됩니다(그림 1B). 용출된 성분들은 분석용 컬럼에서 분리된 후 6475 TQ에서 최종 분석이 수행됩니다. 밸브는 다시 1번 포지션(포트 1→6)으로 전환되어 쿼터너리 펌프에 의해 SPE를 세척 및 안정화하여 다음 분석을 준비합니다.

이러한 Online SPE LC 조건은 대용량 시료를 주입 가능하게 하여 사용자의 편의성을 높일 뿐 아니라 낮은 농도까지 분석을 가능하게 합니다.

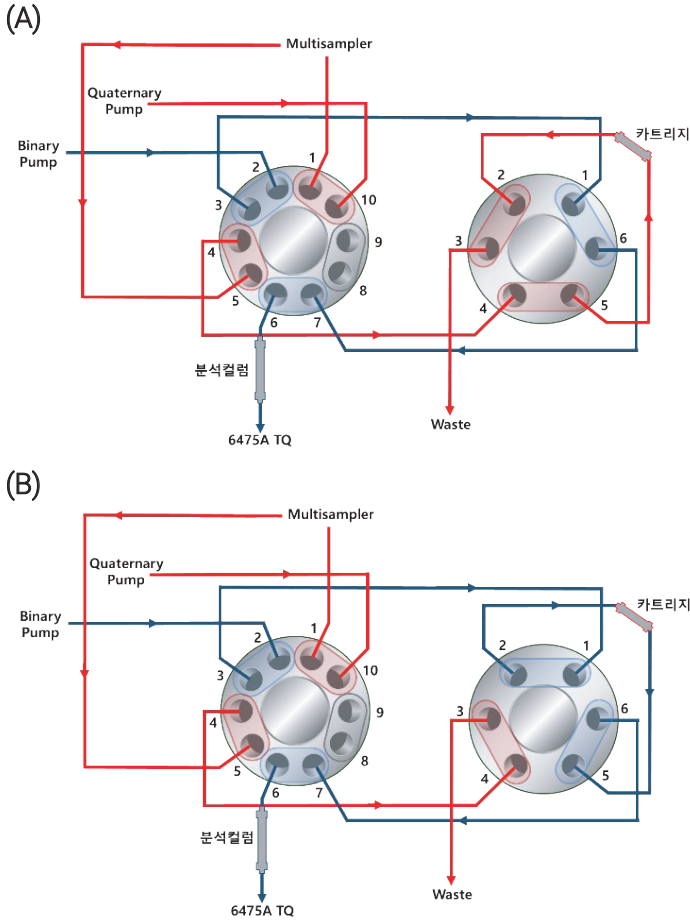


그림 1. Online SPE LC 밸브 구성. (A) 시료 주입 단계 (B) 시료 용출 단계

분석 조건

표 1. Online SPE 조건

구성	세부 정보		
농축펌프	Agilent 1290 Infinity II Flexible Pump		
샘플러	Agilent 1290 Infinity II Multisampler		
SPE 카트리지	Agilent PLRP-S (2.1 x 12.5mm, 5µm)		
주입량	400µL		
이동상	A: Water containing 0.05% formic acid (LC-MS grade) B: Methanol (LC-MS grade)		
유속	0.5mL/min		
그레디언트	Time (min)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
	0.0	95	5
	2.5	95	5
	3.5	0	100
	11.0	0	100
	20.0	95	5
FlexCube 밸브 포지션	Time (min)	값	
	2.0	우측 밸브 포지션 2(포트 1→2)	
	7.0	우측 밸브 포지션 1(포트 1→6)	

표 2. UHPLC 조건

구성	세부 정보		
LC	Agilent 1290 Infinity II LC		
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 2.1 x 100mm, 1.9µm		
컬럼 온도	45 °C		
이동상	A: Water containing 10mM ammonium acetate and 0.1% formic acid (LC-MS grade) B: Acetonitrile containing 0.1% formic acid (LC-MS grade)		
유속	0.4mL/min		
그레디언트	Time (min)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
	0.0	80	20
	2.0	80	20
	6.5	5	95
	10.0	5	95
	10.5	80	20
	16.0	80	20
Post Time	4min		

표 3. Agilent 6475A TQ 조건

구성	세부 정보
장비	Agilent 6475A Triple Quadrupole mass spectrometry
이온화원	ESI with Agilent Jet Stream
수집 모드	Dynamic MRM
가스 온도	350°C
가스 유량	9L/min
Nebulizer	20psi
Sheath 가스 온도	400°C
Sheath 가스 유량	12L/min
캐필러리	(+) 3500V
노즐 전압	(+) 500V
극성	Positive

표 4. 개별 성분에 대한 MRM transition

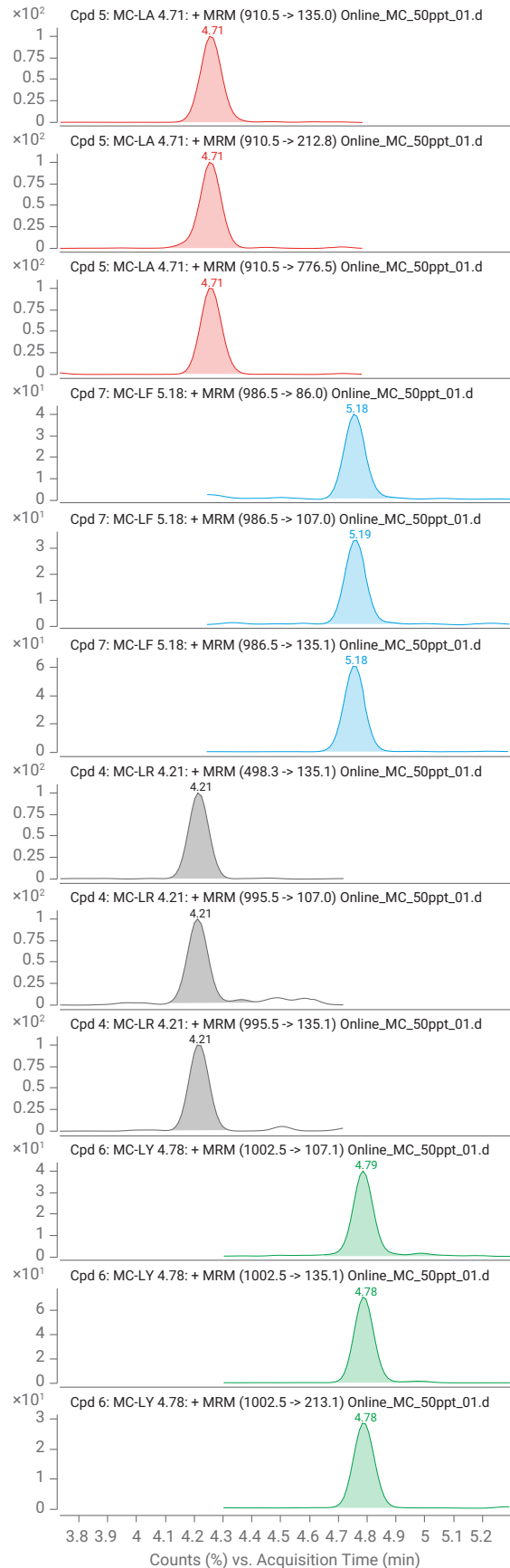
	화합물명	전구 이온 (m/z)	생성 이온 (m/z)
1	MC-LA	910.5	776.5, 212.8, 135
2	MC-LF	986.5	135.1, 107, 86
3	MC-LR	995.5, 498.3	135.1, 107
4	MC-LY	1002.5	213.1, 135.1, 107.1
5	MC-RR	519.8	135, 103, 70
6	MC-YR	1045.5, 523.3	135.1, 103

- 6종 마이크로시스틴은 Dynamic MRM으로 분석되었으며, 세부 정보는 애질런트를 통해 제공받을 수 있습니다.

- 분석조건은 분석의 정확도 및 정밀도가 확인되는 경우 변경될 수 있습니다.

결과

본 응용 자료에서는 LC-MS/MS에 Online SPE 시스템을 장착하여 먹는 물 내 마이크로시스틴 6종(MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LY, MC-RR, MC-YR) 정량 분석 솔루션에 대하여 서술하였습니다. 결과로는 6종 화합물 각각에 대한 선형성과 분석 반복 재현성을 평가하였으며, 정량 분석 결과와 함께 시료에 표준품을 첨가하여 기기 분석 회수율을 평가하였습니다. 각 분석물질의 개별 이온 크로마토그램은 그림 2에서 확인할 수 있습니다.



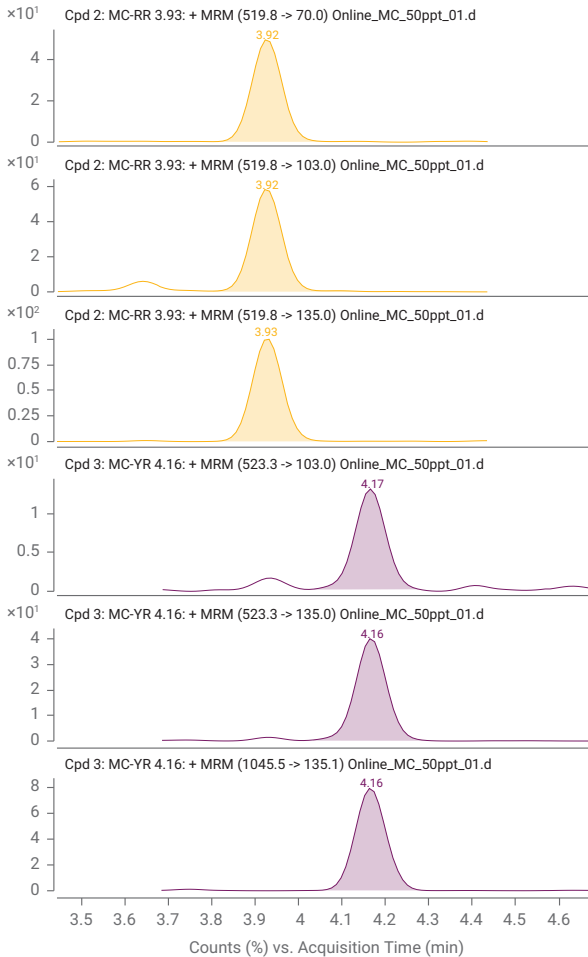


그림 2. 검액 50ppt에서의 마이크로시스틴 6종 MRM 크로마토그램

선형성 및 분석 반복 재현성 평가

6종의 마이크로시스틴에 대해 50ppt, 100ppt, 200ppt, 500ppt, 1000ppt, 2000ppt로 총 6단계의 검정 표준용액을 준비하여 검량선을 작성하였습니다. 각 분석물질의 최저 농도인 50ppt에서의 정량이온 크로마토그램과, 검량선을 통한 선형성 평가결과는 표 5에서 확인할 수 있습니다. 6종의 마이크로시스틴은 모두 R² 값이 0.998 이상의 선형성 결과를 보이며, 검량선의 최저 농도인 50ppt에서도 Blank와 뚜렷이 구분되는 안정적인 피크 검출을 보이고 있습니다.

분석법의 정밀성을 확인하기 위해 반복 재현성 평가를 수행하였습니다. 50ppt 농도로 제작된 검정 표준용액을 5회 반복 분석하여 면적 값에 대한 상대 표준편차(RSD, %)로 재현성을 평가하였습니다. 결과적으로, 6종 마이크로시스틴 모두 다른 방해 물질의 영향 없이, 상대 표준편차가 5% 이하로 안정적인 재현성을 확인했습니다. 이 결과는 표 6에서 확인할 수 있습니다.

표 5. 마이크로시스틴 6성분 50ppt에서의 크로마토그램 및 선형성 결과

성분명	크로마토그램	선형성	검량선
MC-LA		0.9995	$y = 6.918661 \cdot x - 26.740578$ $R^2 = 0.99953883$ $R = 0.9998265$ Type: Linear, OriginIgnore, Weight: 1/x
MC-LF		0.9988	$y = 7.562707 \cdot x - 101.388108$ $R^2 = 0.99881646$ $R = 0.99957379$ Type: Linear, OriginIgnore, Weight: 1/x
MC-LR		0.9985	$y = 22.84020 \cdot x - 468.698014$ $R^2 = 0.99847578$ $R = 0.99988547$ Type: Linear, OriginIgnore, Weight: 1/x
MC-LY		0.9998	$y = 7.957075 \cdot x - 58.117996$ $R^2 = 0.99984193$ $R = 0.999744$ Type: Linear, OriginIgnore, Weight: 1/x
MC-RR		0.9985	$y = 50.732490 \cdot x - 1011.712142$ $R^2 = 0.99847177$ $R = 0.99978327$ Type: Linear, OriginIgnore, Weight: 1/x
MC-YR		0.9981	$y = 20.360032 \cdot x - 412.753023$ $R^2 = 0.99814901$ $R = 0.99983157$ Type: Linear, OriginIgnore, Weight: 1/x

표 6. 마이크로시스틴 6성분 50ppt에서의 분석 반복 재현성 결과

성분	평균 면적 값	상대 표준편차 (RSD, %)
MC-LA	423	4.6
MC-LF	311	5.0
MC-LR	840	3.2
MC-LY	351	2.4
MC-RR	1,897	2.8
MC-YR	752	3.3

정량 결과 및 회수율 평가

먹는 물 내 마이크로시스틴의 정량 분석 및 기기 분석 회수율 평가를 위해 정수 시료를 사용했습니다. 정량 분석 결과, 시료 내 마이크로시스틴은 6종 모두 불검출로 확인하였습니다.

분석의 정확성을 확인하기 위하여 정수 시료에 표준품을 첨가하여 조제한 QC 시료를 통해 기기분석 회수율을 평가하였습니다. 마이크로시스틴 6종 각각에 대하여, 50ppt, 500ppt, 1000ppt에서 회수율을 확인하였으며, 그 결과 MC-LA, MC-LY는 3개의 QC 시료 모두에서 회수율 범위 80%-120% 수준으로 확인되었습니다. MC-LF, MC-LR, MC-RR, MC-YR 4종의 경우, 5ppt에서는 회수율 130.4%-132.9% 수준으로 확인되었으며, 500ppt 및 1000ppt에서는 80%-120% 범위로 회수율이 계산되었습니다. 이는 표7에서 확인할 수 있습니다.

표 7. 먹는 물 내 마이크로시스틴 6종 정량 결과 및 회수율 결과

성분	정량 결과	50ppt 회수율(%)	500ppt 회수율(%)	1000ppt 회수율(%)
MC-LA	-	103.9	114.7	113.6
MC-LF	-	132.2	116.8	113.3
MC-LR	-	130.4	110.7	106.5
MC-LY	-	112.9	114.9	115.3
MC-RR	-	132.9	109.4	106.1
MC-YR	-	130.4	107.3	104.6

결론 및 고찰

본 연구에서는 Agilent의 Online SPE-6475TQ를 이용한 수질 내 마이크로시스틴 6종 (MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LY, LC-RR, LC-YR)의 정량 분석을 수행하였습니다. 특히, Online SPE 시스템을 통해 자동으로 고체상 추출을 수행함으로써 분석의 편의성을 극대화하였을 뿐만 아니라 극미량의 농도까지 정확한 결과를 도출할 수 있었습니다.

실험 결과로, Agilent Online SPE-6475TQ의 뛰어난 민감성과 정확도를 바탕으로 국내 규제 대상인 마이크로시스틴 6종에 대하여 극미량의 농도까지 안정적인 분석이 가능함을 확인하였습니다. 각 화합물에 대하여 선형성, 반복성, 정확성을 평가함으로써, 분석법에 대한 신뢰를 얻을 수 있었으며, 나아가 실제 먹는 물 시료에 대한 적용 가능성을 확인하였습니다.

마이크로시스틴 분석 시, 실험 전 과정에 대한 분석적 결과 신뢰도를 더욱 높이기 위해서는 각 성분에 대하여 동위원소가 치환된 내부 표준품 적용을 권장합니다.

참고 문헌

1. 먹는 물 수질 감시 항목 운영 등에 관한 고시, 환경부 고시 제 2023-149호
2. Automated Online SPE-UHPLC/MS/MS Analysis of Emerging Pollutants in Water, Agilent Technologies Technical Overview, 5994-1819EN, 2020.
3. Quantitation of Microcystins in Water by Direct Injection and Online SPE LC/MS/MS Systems, 5994-0007EN, 2018
4. Agilent Ultivo triple quadrupole LC/MS를 이용한 먹는 물 내 microcystin 및 nodularin 분석, 5991-9087KO

www.agilent.com/chem

DE85885714

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2021
2024년 1월 10일, 한국에서 발행
5994-7313KOKR

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

